

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390115

研究課題名(和文) エイズウイルス複製制御個体で誘導される細胞性免疫反応の解析

研究課題名(英文) Cellular immune responses in AIDS virus controllers

研究代表者

俣野 哲朗 (MATANO, TETSURO)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・センター長

研究者番号：00270653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：HIV複製の制御維持機序を知ることが目的とし、サルエイズモデルでのワクチン接種・サル免疫不全ウイルス(SIV)チャレンジ実験で2年間以上SIV複製が制御された個体群の解析を行った。これらは、ウイルスゲノムgag・nef領域に変異蓄積が認められる群と認められない群とに大別されるという興味深い新知見が得られた。前者では感染後1年目にGag・Nef以外の抗原を標的とする広範な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)反応が認められ、後者はこれまでに報告のない極めて安定したSIV複製制御維持群と考えられた。本研究結果は、HIV感染に対するCTLによる機能的治癒の可能性およびその機序を示すものとして重要である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism for sustained control of HIV replication, this study analyzed vaccinated rhesus macaques that controlled simian immunodeficiency virus (SIV) replication for more than 2 years after challenge. Remarkably, half of these SIV controllers had multiple proviral gag and nef mutations at 2 years whereas the remaining half did not. At 1 year, the former group showed broader cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses targeting viral non-Gag/Nef proteins as well as Gag/Nef, whereas Gag- and Nef-specific CTL responses were still dominant in the latter. The latter group represents an extremely stable SIV control by Gag/Nef-specific CTLs, providing a possible mechanism of functional HIV cure by CTLs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス 感染症 微生物 免疫学 エイズ 細胞傷害性Tリンパ球 変異

1. 研究開始当初の背景

HIV (ヒト免疫不全ウイルス) 感染症は、慢性持続感染の経過をたどりエイズ発症にいたる致死性感染症であり、その克服は国際的重要課題の一つである。感染者の中には、血中ウイルス量が低く長期未発症となる HIV controllers が極めて低頻度ではあるが存在する。その HIV 複製制御にいたる機序および制御状態の維持機序の解明は、HIV 感染制御法を考えるうえで重要である。

このような機序解明には、動物モデルでの解析が有用であるが、唯一最適のサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルにおいては長期未発症の SIV controllers の獲得が容易ではなく、解析が進んでいなかった。私どもはこれまで、DNA ワクチンとセンダイウイルス (SeV) ベクターワクチンとを併用したプライムブースト予防エイズワクチンを開発し、SIV 複製制御にいたる機序を明らかにしてきた (Matano et al, J Exp Med, 2004)。特に、ワクチンにより SIV 複製制御にいたる MHC-I (主要組織適合遺伝子複合体クラス I) ハプロタイプ 90-120-Ia 共有サル群を見出すとともに、その感染急性期の複製制御に中心的役割を担う Gag 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を同定した (Kawada et al, J Virol, 2008)。本研究では、このウイルス複製制御の維持機序の解明に主眼をおき、これまでの研究で得られた SIV 複製制御群の感染慢性期の解析を行った。

2. 研究の目的

HIV 複製の制御維持機序を知ることが目的とし、サルエイズモデルでのワクチン接種・SIV チャレンジ実験で 2 年間以上 SIV 複製が制御された個体群の感染免疫学的解析を行った。

3. 研究の方法

これまでの Gag CTL エピトープを抗原とする DNA プライム SeV ブーストワクチン接種・SIVmac239 チャレンジ実験で、SIV 複製が制御され、感染後 2 年の時点でも血漿中ウイルス量が検出下限 (400 copies/ml) 以下であった 90-120-Ia 共有アカゲサル 7 頭の末梢血由来凍結リンパ球サンプルを用いた。感染後 1 年および 2 年時のリンパ球より DNA を抽出し、SIV gag・nef 遺伝子領域を増幅して塩基配列を解析した。また、感染後 1 年時のリンパ球を用い、SIV 各抗原のアミノ酸配列をカバーするオーバーラッピングペプチドプールによる抗原刺激後のインターフェロン誘導を細胞内免疫染色で検出することによって、抗原特異的 CTL 反応を測定した。

4. 研究成果

まず、感染慢性期のウイルスゲノム変異を解析することとしたが、SIV 複製制御群では、濃縮血漿由来の RNA からでも SIV cDNA の増幅は困難であったため、リンパ球のプロウ

イルスゲノムの塩基配列を解析することとした。SIV 複製制御群では、プロウイルス量も極めて低く、SIV cDNA の増幅は容易ではなかったが、最終的に 7 頭において、感染後 1 年および 2 年のリンパ球由来 DNA より SIV gag・nef cDNA を増幅し塩基配列を解析することができた。感染後 1 年では、SIV 複製制御群全 7 頭において、gag・nef 領域にアミノ酸置換を生じる変異の選択は認められなかった。しかし感染後 2 年では、7 頭中 3 頭 (#11・#12・#13: Group I とした) で gag・nef 領域に多数のアミノ酸置換を生じる変異が選択されていた。一方、残りの 4 頭 (#21・#22・#23・#24: Group II とした) では、2 年時においても変異選択が認められなかった。前者の Group I で選択された変異には、MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 拘束性の Gag206-216、Gag241-249 および Gag367-381 特異的 CTL からの逃避変異を含んでおり (表 1) Group I の 3 頭では、これら Gag 特異的 CTL からの逃避変異の蓄積が進行していることが判明した。

表 1. 各個体における proviral gag 変異*

aa	L216	V243	D244	I247	L372	V375
Group I						
#11	S	A	E			M
#12	S		E	L		M
#13	S	A			F	
Group II						
#21		(no mutation)				
#22		(no mutation)				
#23		(no mutation)				
#24		(no mutation)				

*主要 CTL エピトープ領域のアミノ酸置換を示す。

以前の研究から、本研究で用いた MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有 SIV 感染制御群は、感染急性期に Gag・Nef 抗原特異的 CTL 反応を示し、特に Gag206-216・Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 反応が SIV 複製制御に中心的役割を担うことが判明している。これら 7 頭の感染後 1 年の末梢血リンパ球を用いた SIV 抗原特異的 CTL 反応の解析では、Group I の 3 頭は、Gag・Nef 抗原特異的 CTL 反応に加え、Gag・Nef 以外の 2 つ以上の SIV 抗原を標的とする CTL 反応を示した (図 1)。一方、Group II では、Gag・Nef 以外の 2 つ以上の SIV 抗原を標的とする CTL 反応を示した個体はなく、Vif 抗原特異的 CTL 反応を示した 1 頭以外の 3 頭では、Gag・Nef 抗原を標的とする CTL 反応のみが認められた (図 1)。

以上の結果から、Group I の SIV 複製制御群は不安定な SIV 複製制御状態を示しており、検出限界以下レベルのウイルス複製により誘導される CTL に対する逃避変異の選択、さらにその逃避変異選択に対する新たな抗原特異的 CTL の誘導といったウイルスと宿主

間の相互作用が繰り返され、CTL 標的の広範化とプロウイルスゲノム逃避変異の蓄積が生じていると考えられた。本結果は、CTL 標的の広範化が HIV・SIV 複製制御破綻徴候を示す指標であること示している点でも重要である。一方、Group II は、これまでに報告のない安定した SIV 複製制御維持群で、Gag・Nef 抗原特異的 CTL による SIV 複製の制御機序を示すものである。本研究結果は、HIV 感染に対する CTL による機能的治癒の可能性およびその機序を示すものとして極めて重要である。

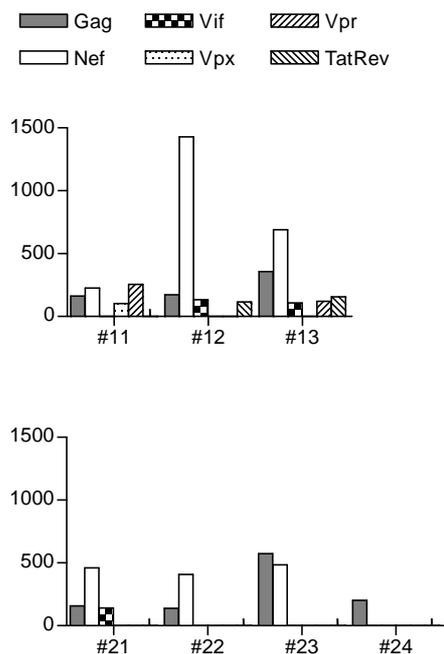


図1 . SIV 抗原特異的 CTL 反応
SIV 複製制御群の感染後 1 年における SIV 各抗原特異的 CTL 頻度(/1x10⁶ PBMCs)を示す。上段は Group I の 3 頭(#11・#12・#13)、下段は Group II の 4 頭(#21・#22・#23・#24)、

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408: 615-619, 2011. 査読有
Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK,

Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol Immunol* 55: 768-773, 2011. 査読有

Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29: 8557-8563, 2011. 査読有

Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86: 738-745, 2012. 査読有

Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbio* 2: 267, 2012. 査読有

Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology* 9: 3, 2012. 査読有

Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86: 6481-6490, 2012. 査読有

Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Akari H, Ishida T, Matano T, Kimura A. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics* 64: 669-678, 2012. 査読有

Nomura T, Matano T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. *Front Microbio* 3: 234, 2012. 査読有

Kurihara K, Takahara Y, Nomura T, Ishii H, Iwamoto N, Takahashi N, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Moriya C, Matano T. Immunogenicity of repeated Sendai viral vector vaccination in macaques. *Microbes Infect* 14: 1169-1176, 2012. 査読有
Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M,

Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8⁺ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8: e54300, 2013. 査読有

Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. IL-21-producer CD4⁺ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect* 15: 697-707, 2013. 査読有

Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8: e73453, 2013. 査読有

Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol* 88: 425-433, 2014. 査読有

Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, Hammond KB, Newman LP, Bimber BN, Nimiyongskul FA, Leon EJ, Maness NJ, Friedrich TC, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor DH, Sacha JB. Tertiary mutations stabilize CD8⁺ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 88: 3598-3604, 2014. 査読有

Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 66: 161-170, 2014. 査読有

[学会発表](計19件)

Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, 9/15/2011.

Ishii H, Iwamoto N, Matsuoka S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse T, Kimura A, Matano T. Efficacy of single epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by vaccination against a simian immunodeficiency virus challenge. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, 9/16/2011.

Matano T. Post-challenge SIV-specific CTL responses in vaccinated macaques. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Joint Meeting of the AIDS Panels, Atlanta, GA, USA, 9/23/2011. 招待講演

Matano T. Impact of prophylactic vaccination with Sendai viral vectors on post-challenge CTL responses in a macaque AIDS model.

The 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, Seattle, WA, USA, 10/2/2011. 招待講演

Matano T. Impact of prophylactic vaccination on post-exposure CTL cooperation against SIV replication in rhesus macaques. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 10/20/2011. 招待講演

侯野哲朗.サルモデルを用いたエイズワクチン開発研究.第4回滋賀医科大学サルシンポジウム:サル類と感染症—最近の話題、大津、12/19/2011. 招待講演

Matano T. HIV vaccine development. Symposium on Research and Quality Control of Vaccines, Beijing, China, 2/20/2012. 招待講演

侯野哲朗. HIV 感染症におけるウイルスと宿主細胞性免疫の相互作用.平成24年度遺伝子制御研究所研究集会:感染・免疫・炎症・発癌、札幌、6/19/2012. 招待講演

Takahara Y, Nakamura M, Matsuoka S, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Impact of therapeutic vaccination on CTL immunodominance and viral suppression in SIV-infected rhesus macaques under HAART. Towards an HIV cure, Pre-conference symposium and The XIXth International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/21 & 7/26/2012.

Matano T. SIV control by vaccine-based Gag/Vif-specific CTL induction. 14th Annual International Meeting, Institute of Human Virology, Baltimore, MA, USA, 10/16/2012. 招待講演

Matano T. Stable viral control in the presence of silent proviruses in a macaque AIDS model. The 13th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 10/24/2012. 招待講演

野村拓志、山本浩之、明里宏文、侯野哲朗. SIV複製抑制マカクサルにおけるCTL逃避変異体の選択による複製抑制破綻機構の解析.第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012.

侯野哲朗.エイズワクチン開発.ポスト日本ワクチン学会シンポ・サテライトシンポジウム、東京、11/19/2012. 招待講演

Matano T. Viral control mechanisms in a macaque AIDS model. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Joint Meeting of the AIDS Panels, Singapore, 3/13/2013. 招待講演

Matano T. Sendai virus vector vaccine. AIDS Vaccine Congress 2013, Barcelona, Spain, 10/9/2013. 招待講演

Matano T. Vif can be a promising CD8 T cell target for HIV/SIV control. The 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 10/29/2013. 招待講演

Nakamura M, Takahara Y, Matsuoka S, Matano T. Reinforcement of CD8⁺ cell capacity to control viral replication by therapeutic vaccination under antiretroviral therapy in SIV-infected rhesus macaques. The 31st annual symposium on non-human primate models for AIDS, Atlanta, GA, USA, 11/4/2013.

野村拓志、俣野哲朗. SIV 感染制御群における制御維持への Vif および Nef 特異的細胞傷害性 T リンパ球反応の関与に関する研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/12/2013.

俣野哲朗. HIV 持続感染成立阻止に結びつく細胞性免疫機序: サルエイズモデルにおける解析. 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、11/20/2013. 招待講演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/arc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

俣野 哲朗 (MATANO TETSURO)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・
センター長
研究者番号: 00270653

(2) 研究分担者

研究者番号:

(3) 連携研究者

研究者番号: